Al mio Ottimo Maestro Sen. Prof. F. Gurelli

*Estratto da* **Biochimica e Terapia Sperimentale**

**Anno VI** **Fascicolo I.**

# Ricerche sul potere antitriptico del siero sanguigno per i Dottori

MILANO
TIPO-LITOGRAFIA VINCENZO CESANA - MILANO
1919

INTENDENZA GENERALE DEL REGIO ESERCITO
REPARTO SPECIALE PER STUDI SULLE CONGELAZIONI E SU PARTICOLARI METODI DI CURA DELLE FERITE DI GUERRA

# RICERCHE
## sul potere antitriptico del siero sanguigno
### per i Dottori

BRUNO QUARELLA - Chirurgo aiuto dell'Ospedale Maggiore di S. Giovanni Battista e della città di Torino. Sezione Chirurgica diretta dal Prof. L. Bobbio.

GIOVANNI VENTURELLI - Assistente volontario presso l'Istituto d'Igiene, della R. Università di Torino, diretto dal Professor Comm. Uff. L. Pagliani.

L'esistenza di una antitripsina nel siero umano è da tempo nota per i lavori di *Camus* e *Gley* (1), *Pugliese* e *Coggi* (46), *Charrin* e *Levaditi* (13), *Landsteiner* (37), *Jacobi* (35), *Glaessner* (23) e molti altri.

Anche negli estratti di organi furono descritte delle antitripsine: tuttavia il loro scambio con enzimi autolitici e relativi antifermenti è in pratica difficile da evitare.

*Achalme* (1) fu il primo ad ottenere un'antitripsina per via immunitaria mediante iniezione di soluzione di tripsina, filtrata per candela, nell'addome di cavie.

In seguito *Jochmann* e *Kantorowicz* (36) giunsero allo stesso risultato mediante iniezioni di leucoproteasi: e ugualmente von Bergmann (5-6) vi riuscì mediante l'innesto di pancreas nella cavità addominale di cani. Anche *Morgenroth* e *Briot* (citati da *Ascoli* e *Bezzola*, 2) indipendentemente l'uno dall'altro, ottennero l'aumento dell'indice antitriptico del siero nelle cavie mediante iniezioni di tripsina. A risultati consimili giunse pure *Sachs*, colla pepsina nelle cavie.

È specialmente l'*Hedin* (27-30) che si è occupato della cosidetta antitripsina del siero normale, da un punto di vista teorico.

L'ipotesi da tale A. sostenuta è che l'albumina serica leghi a sè il fermento e ne impedisca perciò l'azione su di un mezzo idoneo eventualmente presente. La combinazione *albumina-fermento* sarebbe difficilmente reversibile. Resterebbe solo indeterminato il fatto se è l'albumina del siero per se stessa quella che agisce o un eventuale

anticorpo ad essa legato. In conseguenza di ciò (e come del resto anche l'esperienza nostra conferma) l'ordine secondo il quale viene effettuata la mescolanza tra siero, fermento e sostanza digeribile è essenziale per il risultato. Così, ad esempio, se primitivamente si aggiunge della caseina al fermento, l'ulteriore azione ostacolante del siero è assai minore che non se si mescola prima la tripsina con il siero, in quanto che con il primo procedimento già una parte del fermento è stata stabilmente fissata dalla caseina.

Anche il tempo durante il quale fermento e antitripsina stanno fra loro preventivamente a contatto e così pure la temperatura alla quale il contatto permane hanno sensibile influenza sui risultati.

Non vi è chi non ravvisi in ciò una netta analogia fra quanto avviene fra tossine e antitossine. Vale a tal proposito la pena di ricordare i risultati delle esperienze eseguite da *Krause* e *Klug* (33). Tali A. A., in seguito a metodiche misurazioni del potere antitriptico del siero di cavalli, prima durante e dopo il processo di immunizzazione contro la tossina difterica, vennero alla constatazione che *l'aumento del potere antitriptico va di pari passo coll'aumento del contenuto in antitossina del siero*. Di più trovarono che, se si neutralizza l'antitossina mediante l'aggiunta al siero di tossina difterica, il potere antitriptico subisce un ulteriore aumento. Da ciò essi pervennero alla conclusione che gli anticorpi posseggono un'azione triptica la quale è soverchiata dal potere antitriptico del siero (fortemente aumentato, quale ben noto fenomeno reattivo): l'aggiunta della tossina, neutralizzando il potere diastasico degli anticorpi, aumenterebbe di conseguenza il valore dell'indice antitriptico. Gli stessi A. A., in base a ricerche complementari sia sul siero antidifterico che su altri sieri antitossici, credono poter asserire che per l'immunità hanno importanza non soltanto gli anticorpi per se stessi, ma anche le azioni fermentative da essi dipendenti. Nè ciò può far meraviglia oggi, quando i nuovi studii tendono sempre più ad orientarci verso l'idea che alla base dell'immunizzazione stia un processo diastasico.

Si è d'altronde cercato di penetrare il modo d'azione degli anticorpi, vale a dire di farlo entrare nell'ordine di altri fenomeni conosciuti. Ora, fra le molte ipotesi messe innanzi, la seguente, che ha già autorevoli sostenitori e che è basata sugli stretti rapporti fra anticorpi e fermenti ci sembra degna di ogni considerazione. *Anticorpo* è un *termine vago che cela la nostra ignoranza: esso definisce un atto per il suo risultato e non per il suo processo (Fiessinger, 55)*. Esso non conviene più oggi che cominciamo a conoscere la fisiologia leucocitaria. Gli anticorpi non sono probabilmente in realtà che dei fermenti. Il loro modo di azione giustifica una tale concezione. Noi sappiamo, infatti, che la *sensibilizzatrice* (ambocettore di *Ehrlich*) ha un'azione *mordente*, e che l'*alessina (complemento)* interviene, in seguito, per disciogliere. Ora cos'è quest'*atto* a *due tempi* se non ciò che si osserva in numerose azioni fermentative?

Noi sappiamo, ad esempio, che il succo pancreatico isolato non

possiede alcuna azione proteolitica: ma se vi aggiungiamo della macerazione di mucosa intestinale (che non possiede per se stessa attività proteolitica) la digestione s'inizia. Noi esprimiamo quest'atto dicendo che il succo pancreatico contiene una *protripsina* che si combina coll'*enterochinasi* per divenire una *tripsina attiva*. Non esiste una grande analogia fra questo fatto e l'azione complessa della *sensibilizzatrice* e dell'*alessina?*

La batteriolisi prodotta dagli anticorpi può essere considerata come il risultato di un atto diastasico. Benchè i dettagli di questo processo sieno ancora discussi, e noi ci troviamo di fronte all'opinione di *Abderhalden* e degli A. A. tedeschi i quali ammettono che la batteriolisi consista assenzialmente in una *proteolisi determinata da una tripsina serica (fermento di difesa)*, all'opinione degli A. A. americani *Jobling* e *Petersen* i quali negano la proteolisi per insistere piuttosto sull'azione della *lipasi*, e infine a quella di *Fiessinger (loc. cit.)* il quale ravvisa nel fenomeno la risultante di un'*azione simultanea di una proteasi specifica* (che altro non sarebbe se non la *sensibilizzatrice*) e di una lipasi (rappresentata dall'*alessina*), non è per questo men vero che, alla luce delle indagini biochimiche moderne l'idea che alla base dell'immunizzazione siavi un atto diastasico tende sempre più ad essere universalmente accettata.

Ma lasciamo un argomento che ci porterebbe tropp'oltre, e che rappresenta per il tema nostro una digressione, e ritorniamo allo studio dell'antitripsina.

Sono stati sopratutto i clinici i quali in varie circostanze, e malgrado le difficoltà di cui diremo appresso, hanno proceduto a determinazioni quantitative dell'antitripsina del siero umano.

Primi fra loro l'*Ascoli* e il *Bezzola (2)* constatarono nei pneumonici un deciso aumento del potere antitriptico, fino a poco tempo dopo la crisi, aumento seguito poi da una rapida diminuzione. Per converso *Pacchioni* (45) non avrebbe osservato nei bambini oscillazioni apprezzabili dell'indice antitriptico nemmeno durante gravi malattie.

L'interesse maggiore sull'argomento, veniva però poco dopo richiamato dalle ricerche di *Brieger* e *Trebing* (8) i quali osservarono un forte aumento dell'antitripsina negli individui affetti da carcinoma. La prova sarebbe quasi specifica per il carcinoma *(Bergmann, 4)*. Tuttavia *Herzfeld* (3) (come del resto in seguito anche lo stesso *Brieger*) riscontrò un innalzamento dell'indice antitriptico anche in altre gravi malattie. Ad analoga constatazione giunsero anche altri A. A. per il tifo, il *reumatismo articolare, acuto,* e i *processi settici* in genere.

Notiamo ancora che *Reusz* (4) avrebbe riscontrato un aumento dell'indice antitriptico del siero negli anemici e nei clorotici.

Al contrario una diminuzione dell'indice stesso avrebbero trovato *Brieger* e *Trebing* nei sifilitici (fatto contestato dall'Herzfeld).

Ma chi ha dato allo studio del potere antitriptico del siero il maggior impulso e che, a nostro avviso, sembra aver meglio compenetrato il valore e il significato del complesso fenomeno biologico è

stato il *Wright*. L'occasione gli è stata offerta dalla guerra e più precisamente dall'enorme numero di gravi ferite settiche che ne sono state l'immediata conseguenza.

Fra le molte ricerche sorte con rinnovato fervore per le impellenti necessità del momento, quelle del *Wright* portano realmente un prezioso contributo all'importante capitolo della patologia chirurgica delle ferite infette. Si era imposta sin dall'inizio alla sua mente la questione di sapere per quale meccanismo gli essudati delle ferite (e sopratutto di quelle trascurate) si convertivano rapidamente in un mezzo di cultura meravigliosamente propizio per il bacillo della gangrena gazosa e per le molteplici altre specie batteriche infettanti.

In base a diligenti studi e a geniali osservazioni egli è giunto alla conclusione che *il potere antitriptico è quello che impedisce il libero sviluppo dei microorganismi nei liquidi organici (sangue, linfa);* e tale ipotesi ha ricevuto di giorno in giorno ulteriori conferme.

Siamo infatti indotti a credere che il potere antitriptico ostacoli il lavorio digestivo dei microbi, lavorio che condurrebbe alla trasformazione delle albumine naturali del siero e della linfa in un elemento appropriato per la coltura microbica. Sembra risultare da ciò che se la tripsina fosse direttamente o indirettamente aggiunta al siero e agli essudati in genere delle ferite, questi dovrebbero subire una corruzione, un'*alterazione degenerativa in senso* lato, di tale natura da trasformarli in un ottimo terreno culturale per i germi. Ed è in realtà quanto notoriamente avviene nel pus ristagnante a causa della disgregazione dei leucociti e della conseguente liberazione della *leucoprotease* (fermento proteolifico assai vicino, se non identico, nella sua azione fermentativa, alla *tripsina pancreatica*). Sinteticamente e quale corollario delle premesse fatte, risulta, secondo l'espressione di *Wright,* che " *il potere antitriptico è il guardiano del sangue e dei tessuti* ".

In conformità con tale enunciato ci piace ricordare subito (come risulta d'altronde dalle ricerche del *Wright* stesso, di *Zuns* e *Govaerts* e di noi pure) come l'indice antitriptico del siero si elevi costantemente e in proporzioni notevoli in tutti i processi settici, sia locali gravi, che generali, finchè l'organismo lotta vittoriosamente contro l'infezione (sia questa aerobica o anaerobica, gazosa) mentre diminuisce e scompare anche totalmente, tanto *in situ* che nel torrente circolatorio, quando la partita è perduta per l'organismo e il processo volge, il più spesso per generalizzazione setticoemica, all'esito infausto.

Le più interessanti e numerose ricerche sperimentali del *Wright* hanno rapporto al *b. di Welch* (*bacillo Perfringens,* l'agente più comune della gangrena gazosa), e furono dall'A. stesso comunicate alla 3ª *Conferenza interalleata per lo studio delle ferite di guerra,* riunitasi a Parigi nel Novembre 1917.

Ne ricordiamo talune fra quelle degne di maggior interesse.

Nella cultura " *in vitro* " del *b. Perfringens* nel siero ciò che ha somma importanza per lo sviluppo è, secondo il Wright, il *fattore*

*chimico*. Quando questo germe cresce liberamente nel siero esso ne riduce il potere antitriptico e contemporaneamente elabora dei prodotti acidi che nettamente diminuiscono (fino alla sua totale scomparsa) l'alcalinità del siero stesso.

Concordemente a ciò, quando si sono raggiunte queste trasformazioni chimiche del mezzo *(perdita del potere antitriptico e dell'alcalinità)* i microorganismi assumono uno sviluppo tumultuoso (" *en avalanche* „ come dicono i francesi).

Notiamo ancora che, secondo i risultati di recenti ricerche biochimiche degli A. A. americani *Jobling, Eggstein* e *Petersen,* la scomparsa del potere antitriptico (osservata da *Wright* " *in vitro* „) dipende dal fatto che i batteri assorbono i lipoidi del siero (comprendenti sopratutto degli acidi grassi non saturi) ai quali è, in realtà, legato tale potere (come risulta da esperienze dei citati autori).

Ripetiamo, per un parallelo con quanto avviene " *in vivo* „, che alla trasformazione triptica degli essudati purulenti oltrechè un tale fenomeno dell'assorbimento dei lipoidi da parte dei batteri, concorre nel modo più efficace la leucoproteasi liberata nell'ambiente per distruzione dei polinucleati. E notiamo ancora, sia pure incidentalmente, che i microorganismi resistono notevolmente all'azione della tripsina leucocitaria in virtù degli antifermenti lipoidei da essi assorbiti.

Ma torniamo alle ricerche del Wright.

In un'altra serie di esperienze comparative col siero puro non alterato e col siero addizionato di tripsina, l'insigne batteriologo inglese ha riscontrato che in quest'ultimo mezzo (siero tripsinato) lo sviluppo del b. di Welch avviene in modo più rigoglioso e anche con semine così scarse che rimangono sterili nel corrispondente terreno non tripsinato. In correlazione con ciò va ricordato che R. Douglas e L. Colebrook (18) hanno dimostrato per un gran numero di microorganismi come le *emoculture*, d'altronde così frequentemente sterili, possano spessissimo essere rese fertili per mezzo dell'aggiunta di tripsina al mezzo di cultura.

Altre ricerche del *Wright* (benchè per noi meno interessanti) tendono a dimostrare come la neutralizzazione dell'alcalinità del siero anche dopo l'aggiunta della tripsina, aumenti vieppiù le favorevoli proprietà culturali del mezzo per il *bacillo di Welch*.

Infine altre ricerche nel cadavere di animali (conigli) mettono in luce come la perdita del potere antitriptico e dell'alcalinità del sangue si verifichi quale fenomeno costante e spontaneo nel cadavere, indipendentemente dall'azione batterica.

(Ciò dà spiegazione della classica *esperienza di Welch*, da noi pure talune volte ripetuta, e basata sullo sviluppo straordinariamente rigoglioso e rapido del b. Perfringens quale avviene nell'organismo della cavia uccisa subito dopo un'iniezione intravenosa di tale germe e posta per qualche ora in termostato. Si assiste allora ad un'imponente e repentina setticoemia gazosa: caratteristico è sopratutto l'aspetto spugnoso del fegato dato dall'intenso sviluppo locale di gas).

Le esperienze ora riferite del *Wright* ritraggono il loro interesse dal fatto che come l'A. stesso fa giustamente rilevare, esse hanno una portata generale e tendono in parte a chiarire i complessi rapporti che possono intercedere tra microbi e organismo specialmente per quanto riguarda l'eventuale assunzione di poteri patogeni da parte dei germi stessi. Poichè una tale assunzione di proprietà patogene è, in linea generale, da considerarsi come un fenomeno di adattamento, ci sembra interessante, limitandoci ai germi delle ferite, di riportare la classificazione che di essi fa il *Wright,* classificazione basata sulle loro affinità, ma sopratutto sulle facoltà loro culturali nel siero.

Sotto tal riguardo (e come ci riferiscono *Vignes* e *Cayrel*) tale A. divide i microbi in tre gruppi:

*a)* i *sierofiti,* capaci di vivere e moltiplicarsi nel siero che per essi rappresenta un buon mezzo;

*b)* i *siero-saprofiti,* i quali non possono svilupparsi nel sangue che quando questo ha perduto il suo potere antitriptico, potere che inibisce i processi digestivi suscettibili di convertire le albumine del siero in un buon mezzo di cultura;

*c)* i *saprofiti secondarii o imperfetti,* incapaci di svilupparsi nel siero se vi sono trasportati in piccolo numero ma che vi si mantengono e si moltiplicano dopo un inseminamento massimo.

Alla *prima* categoria appartengono lo *streptococco* e lo *stafilococco,* alla *seconda* la più gran parte dei germi delle ferite, alla *terza* il *proteo,* il *piocaneo,* il *difteroide* e in particolare il *perfringens.*

Occorre adunque, secondo *Wright,* a ciò che una ferita divenga un buon mezzo di cultura per la pluralità dei germi, che venga a scomparire il potere antitriptico del siero.

Bisogna notare che tale potere antitriptico, impedendo la proteolisi delle abumine delle ferite, rappresenta un freno all'attività microbica per ciò ancora che le albumine costituiscono un mezzo di cultura meno buono che i peptoni. Di più quando un siero perde il suo *potere antitriptico* esso perde contemporaneamente il suo *potere complementare,* il suo *potere opsonico,* il suo *potere batteriolitico* e la sua *coagulabilità* (vedi *Delbet* e *Fiessinger,* 55). Esso subisce allora la proteolisi, e si trasforma in un mezzo favorevole alla pullulazione microbica.

Ci sembra perciò logico ammettere col *Wright* che *l'aumento del potere antitriptico del siero sanguigno rappresenta una reazione immunitaria aspecifica contro l'infezione.*

Mantenendoci nel campo delle ferite, noi possiamo così concepire il modo d'azione di un tale processo di difesa: nella ferita recente, e ancora ingombra di materiale necrotico in via di disgregazione, il potere antitriptico del siero che trasuda dalle pareti costituisce un

freno alla pullulazione microbica per la sua azione inibitoria sulla proteolisi: e ciò per ammissione anche di A. A. come il *Delbet* e il *Fiessinger* (55) per i quali tuttavia in questo primo stadio la difesa serica sarebbe una difesa che abortisce a causa della rapidità colla quale cessa l'essudazione dalle pareti della ferita.

Più tardi, al periodo della suppurazione il *potere antitriptico è un mezzo di difesa non della ferita ma dell'organismo contro ciò che avviene nella ferita.*

Possiamo, per analogia, pensare a quanto succede in una raccolta ascessuale. L'ascesso è il risultato della messa in opera dei mezzi di difesa contro un germe che non ha il potere di produrre un'infezione generale. Ma tali mezzi di difesa possono divenire pericolosi per i tessuti. È necessario che l'organismo si difenda contro le diastasi che egli ha prodotto. L'aumento del potere antitriptico (favorito nella sua azione dall'abbondante vascolarizzazione delle zone limitrofe all'ascesso, o alla ferita suppurante) è uno dei mezzi di difesa.

Riassumendo, il potere ostacolante del siero interviene nella ferita fresca per arrestare la proteolisi, nella ferita suppurante per limitare l'azione della diastasi leucocitaria e conseguentemente impedire la diffusione per continuità del processo settico: nel primo caso esso agisce *nella ferita,* nel secondo all'*interno della ferita.*

L'aumento del potere antitriptico del siero quale fenomeno reattivo alla liberazione del fermento proteolitico dei leucociti rappresenta una frequente evenienza nel dominio della patologia generale: e noi tale evenienza osserviamo ogni volta che, per una ragione qualsiasi si produce nell'organismo una intensa *leucolisi* (es.: taluni processi infettivi gravi, in particolare la *pneumonite* (febbre precritica) l'*iniezione* di fermenti colloidali, ecc.).

Tuttavia, nell'eziologia del complesso fenomeno che obbiettivamente si traduce coll'aumento del potere antitriptico del siero, all'infuori dell'azione esercitata dalla proteasi leucocitaria altri fattori possono entrare in gioco, come ad esempio la frequente produzione di fermenti da parte dei batteri, nonchè l'eventuale azione diastasica di taluni anticorpi (v. *Klug* e *Krause,* 33), poichè, per una legge generale in biologia, l'aumento dei fermenti provoca una reazione che tende almeno a ristabilire l'equilibrio. Che anche i prodotti di scissione in genere dell'albumina siano capaci di produrre un aumento del potere antitriptico del siero, secondo la teoria di *Pfeiffer* e *Kusznyak,* è contestato dai più recenti A. A. (*Meyer,* 41).

Non erriamo perciò affermando che, data la complessità del fenomeno molti punti restano ancora oscuri riguardo alla sua interpretazione e largo è il campo ancora aperto alle ulteriori indagini.

Ma, poichè il relativo studio è stato da qualche tempo ripreso anche nei riguardi della pratica, vediamo succintamente i risultati forniti dalle recenti indagini cliniche. Fra queste le più importanti sono quelle del *Wright* e quelle di *Zunz* e *Govaerts* (54), e di esse soltanto diremo brevemente.

Wright in una serie di ricerche negli individui normali, ha trovato un indice antitriptico oscillante fra *4,4 e 5* unità (in media *4,7 unità*).

In una serie di individui leggermente feriti tale indice è stato in media di *5,8 unità*.

In una serie di feriti gravi di ogni specie l'A. ha trovato valori oscillanti da *8* a *18 unità* (in media *11,3 unità*).

*Zunz e Govaerts (54),* in base a numerose ricerche eseguite su feriti, sono giunti alle conclusioni seguenti:

1. - Le fratture chiuse delle membra provocano un accrescimento di solito passeggero del potere antitriptico del siero.

2. - Nelle ferite nelle quali l'infezione resta superficiale e non determina febbre, le modificazioni del potere ostacolante del siero di fronte all'azione della tripsina hanno le stesse caratteristiche per andamento ed ampiezza che nelle lesioni asettiche. Esse sembrano dipendere dal trauma iniziale.

3. - Quando esiste la febbre, l'indice antitriptico raggiunge di regola i valori più elevati. Le curve della temperatura e dell'indice antitriptico sono parallele nel loro andamento generale.

4. - Nei feriti le proprietà ostacolanti del siero sono in relazione con due fattori: il *trauma iniziale* e l'*intensità della febbre*. L'interferenza di questi fattori permette forse di spiegare il perchè si osserva spesso, negli individui con lesioni infette, un abbassamento della curva antitriptica dopo 10-15 giorni dal trauma, seguito poi da una nuova elevazione.

Tale abbassamento corrisponde probabilmente al momento in cui l'azione del trauma iniziale cessa di esercitare i suoi effetti.

5. - In determinati *stati di collasso circolatorio* per emorragia e per infezione, come d'altronde anche nei casi di *gravi setticoemie,* ogni elevazione dell'indice antitriptico può essere assente.

6. - Nella gangrena gazosa l'innalzamento del potere antitriptico del siero coincide non di rado con una diminuita virulenza del processo settico.

Esposti così succintamente i risultati clinici fino ad oggi ottenuti, veniamo ora alle nostre ricerche.

Quando, parecchi mesi or sono, noi cominciammo a studiare la questione del potere antitriptico del siero, fummo anzitutto colpiti dal fatto della mancanza di una tecnica ben definita e precisa e concordemente accettata dalla maggioranza almeno dei ricercatori.

Gli A. A. infatti hanno sin qui usato tecniche singolarmente disparate con risultati essenzialmente diversi.

Come ben osserva il *Launoy* (38) *" per quanto inverosimile ciò possa apparire, l'uniformità nella tecnica e nei reattivi non è stata per così dire mai realizzata sistematicamente nelle ricerche sul potere antitriptico del sangue* (v. anche *Achalme*, 1).

Ce ne possiamo facilmente convincere esaminando i metodi fino ad oggi impiegati.

Taluni A. A. (*Krause* e *Klug, Brieger* e *Trebing* ed altri) si sono serviti del metodo originariamente ideato da *Jochmann* e *Müller* per la dimostrazione del fermento proteolitico dei leucociti e del corrispondente antifermento.

Esso consiste essenzialmente nel portare su una *piastra di Löffler (siero di bue, piastra di tre giorni)* una serie di goccie costituite da singole ansate del siero in esame. Ogni goccia di siero viene poi mescolata con un numero variabile (da 1 a 20) di ansate di soluzione di tripsina all'1 %.

La piastra è lasciata per ventun'ore a 55° in termostato e il formarsi o non di escavazioni si prende come criterio per giudicare quanto fermento fu ostacolato nella sua azione. (Così, ad esempio, l'espressione 1 : 5 significa che 5 ansate di tripsina furono ancora neutralizzate da un'ansata del siero.)

È pressochè inutile osservare che le differenze tra le singole piastre, le oscillazioni nel grado di alcalinità, le disuguaglianze fra le ansate e altre cause di errore, rendono piuttosto grossolana e problematica la misurazione del potere antitriptico con tal metodo. Vi è ancora da aggiungere, secondo la nostra personale esperienza, le difficoltà e le incertezze che si verificano talvolta nell'apprezzamento dell'inizio delle escavazioni, inizio, d'altronde, che, con eguale quantità di siero e tripsina, può in taluni casi esservi, in altri no.

Di più, secondo *Bergmann* e *Meyer*, la temperatura di 55° non sarebbe conveniente per la prova, in quanto a tale temperatura tanto la tripsina che l'antitripsina, subiscono un forte indebolimento nella loro azione, indebolimento d'altronde che non è di pari grado per le due sostanze.

Altri A. A. e primi fra questi *Bergmann* e *Meyer* (6) hanno usato una tecnica desunta dal metodo ideato da *Gross* (24) e *Fuld* (22) per la titolazione della tripsina.

Non entriamo in dettagli per non ripeterci a proposito della descrizione del metodo da noi proposto il quale, fondato pure sul saggio di digestione di una soluzione di caseina da parte della pancreatina secondo la tecnica di *Fuld* e *Gross* non costituisce in realtà che un notevole perfezionamento del metodo di *Bergmann* e *Meyer*.

Osserviamo tuttavia che un tale metodo, applicato secondo le indicazioni date dai due A. A. tedeschi, non fornisce che valori grossolanamente approssimativi. Mancando in esso una precisa titolazione preventiva del potere diastasico della soluzione impiegata, i risultati numericamente espressi, andrebbero soggetti a non lievi oscillazioni da una serie all'altra di esperienze (a seconda appunto del reale potere

fermentativo della soluzione di tripsina). E ciò è tanto vero che gli A. A. stessi si limitano ad indicare i risultati ottenuti in modo soltanto approssimativo con le espressioni grafiche —, ±, + e ++, in mancanza di più precisi ragguagli forniti dalla loro tecnica.

Ricordiamo infine che alcuni ricercatori, e fra questi l'*Ascoli* e il *Bezzola* (2) hanno usato per la misurazione dell'indice antitriptico, una tecnica basata sul computo del potere d'arresto, da parte del siero, della digestione della *gelatina* per mezzo della tripsina (v. *Berl. Klin. Woch. 1903 pag. 391*).

Una tale tecnica, la quale finora ha avuto scarsi seguaci, è stata recentemente rimessa in onore dal *Launoy* (38-39) con modificazioni però e perfezionamenti notevoli dei quali diremo brevemente appresso.

Per ora riteniamo solo interessante far rilevare come i metodi fin qui descritti non permettono di ottenere, nella misurazione del potere antitriptico che dei dati relativi e variabili da serie a serie di esperienze.

Poichè è nota la grande variabilità di potere digestivo tra le varie tripsine del commercio (sia pure delle migliori) ne consegue che i valori ottenuti non sono utilizzabili che paragonandoli a quelli simultaneamente ottenuti in una serie di individui normali. Da ciò la difficoltà pratica di eseguire la ricerca, assieme alle altre indagini cliniche, in casi isolati e l'impossibilità di servirsi, per un criterio comparativo, dei risultati ottenuti da altri autori.

Ne diamo un esempio.

È noto che Wright computa il potere antitriptico del siero sanguigno cercando quale è diluizione di tripsina neutralizzata da un volume uguale di siero, dividendo 100, in ciascun caso, per il numero che rappresenta questa diluizione. (Così, ad esempio, coll'espressione 5 unità l'A. intende significare che il siero in esame neutralizza, a volumi uguali, una soluzione di tripsina all'1 : 20 (perchè 100 : 20 = 5).

*Wright* ha fissato, in una numerosa serie di esperienze per gli individui normali dei valori oscillanti da 4 a 5 unità. Esperimentando con una tripsina Merck noi ottenemmo, nelle identiche condizioni, dei valori variabili da 8 a 10 unità; il che verosimilmente altro non significa se non che la tripsina impiegata dal Wright aveva un potere digestivo doppio di quello della nostra.

Per tanto la tecnica che in base a ripetute ricerche, noi abbiamo determinato e che qui brevemente esporremo, ha lo scopo di ovviare a questi gravi inconvenienti e di fornire nel contempo dei valori per quanto è possibile assoluti (data, s'intende, l'invariabilità dei reattivi da noi stabiliti).

Ci si è imposta perciò la necessità di stabilire una "*unità diastasica*" e a tal fine noi siamo ricorsi al metodo per il dosaggio della tripsina proposto da *Fuld* e *Gross* e perfezionato dalla Dott. *Neppi* (43).

La necessità di determinare una unità diastasica è stata recentemente riconosciuta anche dal *Launoy* (39-40). Secondo tale A. essa è rappresentata da *una soluzione della quale cc. 0,1 liquefanno in un'ora*

*a 45° completamente due cc. di una gelatina di speciale preparazione, mentre la liquefazione è incompleta dopo soli 45'.*

A parte una certa complessità nei dettagli tecnici, ci sembra che i risultati del metodo debbano necessariamente essere influenzati dall'imprecisione dell'unità diastasica determinata.

Diciamo subito che l'unità diastasica, da noi convenzionalmente stabilita, è rappresentata *da una soluzione di tripsina tale che un cc. di essa digerisca completamente cinque cc. di soluzione all'1 °/oo di caseina purissima in 15' a 40°.*

Ed ora ecco nei suoi dettagli la tecnica da noi impiegata.

Si prepara anzitutto:

*a)* Una *soluzione di tripsina all'1 °/o* stemperando accuratamente centigrammi 30 di tripsina in cc. 30 di soluzione fisiologica. Talune tripsine del commercio non sono completamente solubili nella soluzione fisiologica ed è necessario all'uopo sostituire una parte di detta soluzione con glicerina, nonchè aggiungere talvolta poche goccie di soluzione normale di idrato sodico.

Benchè non ci sia sembrato, nelle nostre ricerche che ciò possa influire in modo sensibile sui risultati, noi consigliamo di impiegare sempre una tripsina perfettamente solubile in soluzione fisiologica, quale noi abbiamo potuto a richiesta avere dall' Istituto Sieroterapico Milanese.

La soluzione di tripsina viene in seguito filtrata dapprima attraverso carta da filtro e poi attraverso candela di Berkfeld, raccolta sterilmente e conservata in ghiacciaia. (In tali condizioni il suo potere litico si mantiene costante per lungo tempo.) Essa viene poi diluita parzialmente volta per volta al momento dell'uso.

*b)* Una *soluzione di caseina purissima all'1 °/oo* che si prepara (secondo *Gross*) sciogliendo *un grammo* di caseina purissima *(I. S. M.)* in un litro di soluzione all' 1 °/oo di carbonato sodico, riscaldando a bagno-maria.

*c)* Il *reattivo idro-alcoolico di acido acetico* (così composto: *alcool a 95 cc. 45, acqua distillata cc. 50, acido acetico cc. 5* - v. *Neppi, 43).*

La tecnica per la misurazione del potere antitriptico da noi proposta consta di due tempi e cioè: *1° - Titolazione preventiva della tripsina. 2° - Prova propriamente detta.*

**Titolazione preventiva della tripsina.** — È questo il tempo più importante a più delicato, nè sarà superfluo insistere sulla rigorosa applicazione di ogni dettaglio tecnico, da ciò dipendendo sopratutto l'esattezza dei risultati che si ottengono. A ovviare possibili errori è pure consigliabile ripetere due o tre volte tale saggio di titolazione.

Si comincia col preparare una soluzione di tripsina all' 1 °/oo (partendo da quella madre).

In una serie di dieci tubi d'assaggio numerati da uno a dieci, vengono posti in ciascuno 5 cc. della soluzione di caseina e quindi quantità decrescenti di acqua distillata, e cioè: 0.9, 0.8, 0,7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0 cc.

I tubi vengono ora portati a bagno-maria a 40° per qualche tempo ed estrattili (una volta che hanno raggiunta tale temperatura) vengono immediatamente addizionati di quantità crescenti di soluzioni di tripsina (da cc. 0-1 nel primo tubo a cc. 1 nel 10°).

Rimessili nel bagno-maria e a partire da tale momento vi si lasciano per *15 minuti precisi,* dopo di che vengono addizionati di poche goccie ciascuno del reattivo alcoolico acetico. Benchè il tempo di esecuzione sia brevissimo è consigliabile di avere l'avvertenza di aggiungere il reattivo precipitante nei varî tubi seguendo lo stesso ordine tenuto nell'aggiunta del fermento.

Per l'azione di un tale reattivo restano limpidi i tubi nei quali la caseina è completamente digerita mentre gli altri si intorbidano. Il primo tubo limpido ci dà il titolo della soluzione in esame. Poichè convenzionalmente la soluzione che ha il titolo di una unità è quella di cui un cc. digerisce i 5 milligrammi di caseina nelle condizioni dell'esperienza (in altri termini quella che al dosaggio dà come primo tubo limpido il decimo) il titolo della soluzione in esame è subito ricavato dalla seguente tabella:

*Tabella A - N. 1*

| Numero dei tubi. . . . | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Unità triptiche . . . . . | 10 | 5 | 3.3 | 2.5 | 2 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.1 | 1 |

Così, ad esempio, se il primo tubo limpido è il sesto, il titolo della soluzione è di *U. I., 6.*

Può tuttavia darsi che con la soluzione all' 1 ‰ tutti i tubi risultino torbidi o viceversa che tutti siano limpidi. Nel primo caso si preparerà (sempre dalla soluzione madre) una soluzione più concentrata (per esempio: 1 : 500 o 1 : 200); nel secondo caso invece una soluzione più diluita (1 : 5000, 1 : 10.000) così da aversi ad ogni modo in ambo i casi una soluzione titolabile fra i 10 tubi e che servirà per la prova del potere antitriptico del siero.

**Prova propriamente detta.** — Schematicamente occorre per ogni prova una serie di 20 tubi (naturalmente il numero di essi potrà essere ridotto, nei singoli casi, in rapporto col titolo della soluzione di tripsina impiegata e a seconda della particolare categoria dei soggetti in esame).

In ciascuno dei primi dieci tubi vengono posti con una pipetta graduata *cc. 0,1* di siero (siero di coagulo) diluito all' 1 : 10 con solu-

zione fisiologica: in ciascuno degli altri dieci la stessa quantità di siero ma alla diluizione dell' *1 : 20.* In seguito ciascun tubo viene addizionato di quantità di soluzione di tripsina proporzionalmente crescenti come da tabella N. 2.

*Tabella N. 2*

| Numero dei tubi. . . | 1° | 2° | 3° | 4° | 5° | 6° | 7° | 8° | 9° | 10° | 11° | 12° | 13° | 14° | 15° | 16° | 17° | 18° | 19° | 20° |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Siero al 1:10 c.c. . . | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Siero al 1:20 c.c. . . | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Sol. di tripsina titol. c.c. | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,- | 0,55 | 0,6 | 0,65 | 0,7 | 0,75 | 0,8 | 0,85 | 0,9 | 0,95 | 1,— |

Si avrà l'avvertenza, nel mettere nelle singole provette la quantità di siero e di tripsina, di portarle colla pipetta graduata sul fondo delle provette stesse, evitando di bagnarne le pareti.

Il contenuto dei singoli tubi è portato ad eguale volume mediante aggiunta di soluzione fisiologica ed accuratamente mescolato. Indi la serie dei tubi viene portata per un'ora in termostato a 37°. In seguito i singoli tubi sono addizionati di *tre c.c. di soluzione di caseina all' 1 °/oo* (quella stessa impiegata per la titolazione della tripsina), riscaldati a bagno-maria fino alla temperatura di 45°, e portati per *sei ore in termostato a 45°.*

L'aggiunta del reattivo acetico ci indicherà allora in quali tubi la digestione della caseina è stata inibita e in quali no.

Convenzionalmente noi prendiamo come *indice antitriptico (I. A.)* il valore corrispondente all'ultimo tubo torbido.

Il computo è dei più semplici: per ottenere l'*I. A.* si moltiplica il numero di serie del tubo per il numero che rappresenta il titolo della soluzione di tripsina, a sua volta moltiplicato per 10 (per i primi dieci tubi nei quali il siero è diluito all' 1 : 10), o per 20 (per gli ultimi dieci tubi). Così, se usando una soluzione di tripsina del titolo di *unità 1,6,* l'ultimo tubo torbido è il quarto, *l'indice antitriptico* sarà *= 64.*

È ovvio notare che col metodo da noi proposto (come del resto con qualsiasi altro) non si ottengono, a rigore, dei valori antitriptici assoluti, ma solo dei *valori limiti* (valore immediatamente inferiore e valore immediatamente superiore). Così l'*I. A.* del siero in esame sarebbe in realtà compreso tra il valore dell'ultimo tubo torbido e quello del primo limpido. Per tanto è consigliabile, qualora si proceda a delicate ricerche e in vista di una maggiore esattezza, riferire nei singoli casi il titolo della soluzione diastasica impiegata.

Allo stesso scopo noi abbiamo pure correntemente l'avvertenza di non impiegare per le ricerche soluzioni di tripsina di titolo molto alto (superiore a due unità).

Nel nostro studio sul potere antitriptico del siero noi abbiamo avuto essenzialmente di mira di stabilire norme precise per una tecnica ben definita. Volendo saggiare l'esattezza del metodo da noi proposto, l'abbiamo eseguito contemporaneamente con diverse tripsine, previamente titolate con ogni cura.

Non diremo di tutte le modificazioni riguardo ai dettagli tecnici che, nel corso dello studio, abbiamo creduto opportuno introdurre. Accenneremo solo ai risultati ottenuti una volta fissato il metodo, in un certo numero di soggetti normali e patologici esaminati.

Eccoli in succinto:

In una serie di individui normali a digiuno (in numero di 22), ottenemmo, col nostro metodo, valori oscillanti tra *20* a *50* (in oltre metà dei casi, fra 30 e 40). In 6 di questi soggetti l'*I. A.* è stato determinato tanto a digiuno che durante il periodo digestivo: l'aumento dell'*I. A.* durante la digestione non è risultato costante: noi l'abbiamo osservato solo quattro volte su 6 nè mai si è mostrato di grado elevato. Tale *I. A.* è stato in 3 casi di circa il terzo e in un caso della metà superiore a quello del corrispondente *I. A.* determinato a digiuno.

L'*I. A.* determinato a diversi intervalli di tempo, nello stesso soggetto, a digiuno, si è dimostrato costantemente uguale.

In una serie di feriti delle parti molli e dello scheletro di gravità media e a decorso normale abbiamo trovati *I. A.* variabili da *60* a *120*.

Durante l'acme di un processo erisipelatoso in un ferito della faccia l'*I. A.* salì a *160*.

In un caso di osteomielite grave, datante da oltre due mesi, con ascessi metastatici multipli, l'*I. A.* risultò di *170*.

In due soggetti operati di ernia inguinale, in etere-narcosi, l'*I. A.*, determinato *prima* dell'intervento e *8 ore dopo*, ha rilevato una diminuzione, in un caso da 30 a 20 (titolo della soluzione triptica U. 1), nell'altro da 48 a 16 (titolo della S. T. U. 1,6).

Sbattuto con etere o cloroformio il siero normale ha costantemente rivelato, in diverse esperienze, la perdita completa del suo potere antitriptico.

L'*I. A.* dei conigli (in 4 prove) risultò variare da *15* a *30* L'*I. A.* a *30* d'una cavia salì a *110*, 24 ore dopo una iniezione endoperitoneale di 6 cc. di soluzione di tripsina all'1 %.

Il metodo da noi descritto è semplice e di facile esecuzione; esso, in virtù della titolazione preventiva della soluzione diastasica, ha il grande vantaggio di poter fornire ai diversi ricercatori valori fra loro comparabili: pertanto esso ci sembra il più preciso e il più pratico, e di conseguenza, il preferibile per la determinazione di questa costante umorale che appare essere, in condizioni normali e patologiche, il potere antitriptico del siero sanguigno.

---

# BIBLIOGRAFIA


1) *Achalme.* — Propr. pathog. de la trypsine. Ann. Pasteur XV, 737 (1901).

2) *Ascoli e Bezzola.* — Das Verh. des antitrypt. Vermögens des Blutserums bei der Kroup. Pneumonie. - Berl. Klin. Woch 1903, N. 17.

3) *Bayliss and Starling.* — Relation of enterokinase to trypsin. J. of phys. 32, 129.

4) *v. Bergmann.* — Klin. Bedeutg. d. trypt. F. unsw. - Med. Klinik 1909 H. 1.

5) *v. Bergmann und Bamberg.* — Bed. des Antitr. im Blute. - Berl. Klin. Woch. 1908, 1396.

6) *v. Bergmann und Meyer.* — Über die klin. Bed. der Antitrypsinbest. im Blute. - Berl. klin. Woch 1908, H. 87.

7) *Brenner.* — Deut. Med. Woch. 1909, N. 9, p. 309.

8) *Brieger uud Trebing.* — Berl. klin. Woch. 1908, N. 22. 29, 51.

9) *Bourquelot et Gérissey.* — Recherches rel. à la quest. des antiferments. Soc. de Biol. 7 Févr. 1903.

10) *Camus and Gley.* — Act. d. sér. sang. s. qu. ferm. dig. - Soc. de Biol. t. XLVII. f. 825 (1907).

11) *Carnot et Mauban.* — Estimation clin. du pouv. trypt. par clarifications d'emulsions troubles d'ovoalbumine. - Soc. de Biol. t. 81 anno 1918. Sedut. del 13 Aprile 1918.

12) *Catchart.* — On the antitr. action of normal terms. - J. of phys. 31, 497.

13) *Charrin et Levaditi.* — Défense de l'org. contre l. sécr. gland. - Soc. Biol. t. 52, f. 83, anno 1900.

14) *Citron J.* — I metodi dell' immundiagnosi e dell' immunterapia e le loro applicazioni pratiche. - II Ed. Un. Tip. Ed. Tor.

15) *Dastre et Stassano.* — Exist. d'une antikinase chez les parasites intestinaux. - Soc. Biol. t. 55, 130, 254 (1903).

16) *Delezenne.* — Sur l'act. antikinas. du sérum sanguin. - Soc. Biol. t. LV, 32 (1903).

17) *Delezenne et Frouin.* — Soc. de Biol. 14 Juin 1912.

18) *Douglas and Colebrook.* — The Lancet, 1916 Vol. II, pag. 180.

19) *Effront.* — Les catalyseurs biochimiques. - Demot et Pinat. Paris 1914.

20) *Fermi.* — Centr. f. Phys. 1894.

21) *Fiessienger et Marie.* — Les ferments digestifs des leucocytes. - A. Maloine. Paris 1910.

22) *Fuld und Levison.* — Bioch. Zeit. 473 (1907).

23) *Glaessner.* — Über die Antitrypt. Wirk. des Blutes. - Hofm. Beitr. t. IV. 79 (1903).

24) *Gross.* — Berl. klin. Woch. 1908, p. 645.

25) *Guleke.* — Arch. f. klin. Chir. - Bd. 78, 1906.

26) *Hahn.* — Berl. klin. - Woch. 1897.

27) *Hedin.* — On the antitrypt. act. of Seroalbumin. - J. of phys. 32, 390 (1905).

28) *Hedin.* — Trypsin and Antitrypsin. - Bioch. J. II, 474 (1906).

29) *Hedin.* — On extraction by casein of trypsin etc. - Bioch. J. II, 81 (1907).

30) *Hedin.* — Über die Aufunahme von Trypsin durch versch. - Subst. Z. phys. Ch. t. 50, 497 (1907).

31) *Herzfeld.* — Beitrag zur Briegerschen Reaktion. - Berl. klin. Woch. 1908 H. 49.

32) *Kämmerez.* — Zur trage der Antitryp. Wirk des Blutserums. Münch. Med. - Woch. 1912, S. 1873.

33) *Krause und Klug.* — Bezichungen Zwischen Immunität und Fermentwirk. - Berl. Klin. Woch. 1908, S. 1454.

34) *Kirchheim.* — Unters. über die Natur der Trypsinhemmung des Serums. Arch. f. Exper. Path. u. Pharmacol. - Bd. 73, 1913 S. 139.

35) *Jakobi.* — Über die Einw. von Tr. auf Serum. - Bioch. Zeit. t. X, 232 (1908) e t. I, 53 (1906).

36) *Jochmann und Kantorowicz.* — Über Antitrypsine und Antipepsine im menschl. Blutserum. Münch. Med. - Woch. 1908 N. 14 e Z. Klin. Med. t. 66 H. 1/2.

37) *Landsteiner.* — Z. K. d. antif. W. des Blutserums. - Centr. f. Bakt. t. 27, 357 (1900).

38) *Launoy.* — Pouvoir autitrypt. du sér. sang. - Soc. de Biol. t. LXXXI. 1918 N. 8. Jéance du 17 Avr. 1918.

39) *Launoy.* — Principes d'une technique pour suivre la marche de la proteolise dans un milieu " gélatine-trypsine „. - Soc. Biol. t. LXXXI, p. 742.

40) *Linossier.* — Sur l'antipepsine du sér. norm. - Soc. de Biol. t. LXXXI, N. 8, 27 Avr. 1918.

41) *Meyer.* — Über das Yerh. des Serumantitrypsin bei der Anaphylaxie. Zeit. r. Immunitätforsch. - Orig. Bd. 19, 1913, S. 179.

42) *Mohr.* — Über Unters. des mütterl. und Kindl. Serums ni seiner antitrypt. - W. Diss. Würzburg 1907, B. C. VII, 67.

43) *Neppi B.* — Per un metodo di dosaggio dei fermenti proteolitici. - Boll. Chim. Farm. Fasc. 10, 30 Maggio 1915.

44) *Oppenheimer C.* — Die Fermente. - Vogel, Leipzig 1913, p. 382.

45) *Pacchioni.* — Ric. sul pot. antitript. del siero di sangue nell' età infant. Riv. di Clin. Ped. 1905, vol. IV, 2103.

46) *Pugliese e Coggi.* — Boll. Scienze Mediche 1897.

47) *Reusz.* — Über den Antitrypsingehalt des Serums bei Sängling. - Wien. Klin. Woch. N. 34, 26 Ag. 1909, p. 1171.

48) *Rubinstein.* — Rech. sur le pouv. antipeptique du Serum. - Ann Inst. Pasteur t. 27, 1913, p. 1074.

49) *Volhard.* — Münch. Med. - Woch. N. 49 (1913) e N. 9 (1907).

50) *Weinland.* — Über Antifermente. - I und II Z. Biol. Bd. 44, 1, 46 (1902).

51) *Welsch.* — Rôle antitrypt. de la cell. hep. - Arch. phys. VII, 235 (1909).

52) *Wright.* — Des cond. qui gouvern. le développ. du bac. de la gangrène gazeuse, etc. - Cenfér. Interalliée pour l'Étude des Plaie de guerre. - Arch. de Méd. et de Pharm. Mil. t. LXIX N. 1-2.

53) *Zunz.* — Soc. de Biol. 11 Mai 1918.

54) *Zunz et Govaertz.* — L'index antitrypt. du sérum sanguin chez les blessés. - Soc. de Biol. t. LXXXI, N. 4, Séance du 23 Fèvr. 1918.

55) Annales de la Clinique Chirurgicale du Prof. Delbet. N. 6, 1918. Biologie de la Plaie de guerre. (Delbel et Fiessinger.)